

PATENT

Docket No. JCLA12308

page 1

IN THE UNITED STATE PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re application of : SHINICHI TSUZAKI et al.

Application No. : 10/727,292

Filed : December 02,2003

For

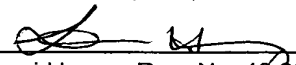
METHOD FOR PRODUCING
COMPOSITION CONTAINING SOLUBLE
: ISOFLAVONES

Certificate of Mailing

I hereby certify that this correspondence and all marked attachments are being deposited with the United States Postal Service as certified first class mail in an envelope addressed to: Commissioner for Patents, P.O.BOX 1450, Alexandria VA 22313-1450, on

March 24, 2004

(Date)


Jiawei Huang, Reg. No. 43,330

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

Transmitted herewith are TWO (2) certified copy of **Japan** Application No. **2001-187783** filed on **June 21, 2001** and application No. **PCT/JP02/06252** filed on **June 21, 2002**.

A return prepaid postcard is also included herewith.

It is believed no fee is due. However, the Commissioner is authorized to charge any fees required, including any fees for additional extension of time, or credit overpayment to Deposit Account No. 50-0710 (Order No. JCLA12308).

Date: 3/24/2004

By: 
Jiawei Huang
Registration No. 43,330

Please send future correspondence to:

J. C. Patents
4 Venture, Suite 250
Irvine, California 92618
Tel: (949) 660-0761

日 本 国 特 許 庁

JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類は下記の出願書類の謄本に相違ないことを証明する。
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 6月21日

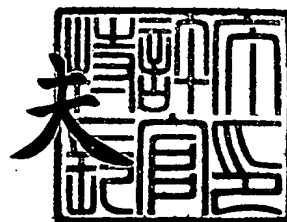
出 願 番 号
Application Number: PCT/JP02/06252

出 願 人
Applicant (s): 不二製油株式会社
津崎 真一
荒木 秀雄
橋本 征雄

2003年 12月 25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号.	PCT/JP 02/06252
0-2	国際出願日	21.06.02
0-3	(受付印)	PCT International Application 日 本 国 特 許 庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.06.2002)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	PP12451W0
I	発明の名称	可溶性イソフラボン含有組成物の製造方法
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除くすべての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	不二製油株式会社
II-4en	Name	FUJI OIL COMPANY, LIMITED
II-5ja	あて名:	542-0086 日本国 大阪府 大阪市 中央区西心斎橋2丁目1番5号
II-5en	Address:	1-5, Nishishinsaibashi 2-chome, Chuo-ku Osaka-shi, Osaka 542-0086 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
II-8	電話番号	+81-724-63-1564
II-9	ファクシミリ番号	+81-724-63-1943
III-I	その他の出願人又は発明者	
III-I-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-I-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-I-4ja	氏名 (姓名)	津崎 真一
III-I-4en	Name (LAST, First)	TSUZAKI, Shinichi
III-I-5ja	あて名:	598-8540 日本国 大阪府 泉佐野市 住吉町1番地 不二製油株式会社阪南事業所内
III-I-5en	Address:	c/o Fuji Oil Company, Limited, Hannan Factory 1, Sumiyoshi-cho Izumisano-shi, Osaka 598-8540 Japan
III-I-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-I-7	住所 (国名)	日本国 JP

III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4j a	氏名(姓名)	荒木 秀雄
III-2-4e n	Name (LAST, First)	ARAKI, Hideo
III-2-5j a	あて名:	598-8540 日本国 大阪府 泉佐野市 住吉町1番地 不二製油株式会社阪南事業所内
III-2-5e n	Address:	c/o Fuji Oil Company, Limited, Hannan Factory 1, Sumiyoshi-cho Izumisano-shi, Osaka 598-8540 Japan
III-2-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-2-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4j a	氏名(姓名)	橋本 征雄
III-3-4e n	Name (LAST, First)	HASHIMOTO, Yukio
III-3-5j a	あて名:	598-8540 日本国 大阪府 泉佐野市 住吉町1番地
III-3-5e n	Address:	c/o Fuji Oil Company, Limited, Hannan Factory 1, Sumiyoshi-cho Izumisano-shi, Osaka 598-8540 Japan
III-3-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-3-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-3-8	電話番号	+81-724-63-1564
III-3-9	ファクシミリ番号	+81-724-63-1943
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 代理人又は共通の代表者が選任されておらず、下記枠内に特に通知が送付されるあて名を記載している	通知のあて名 (address for correspondence)
IV-1-1ja	名称	不二製油株式会社 特許商標室
IV-1-1en	Name	FUJI OIL COMPANY, LIMITED INTELLECTUAL PROPERTY DEPT.
IV-1-2ja	あて名:	598-8540 日本国 大阪府 泉佐野市 住吉町1番地
IV-1-2en	Address:	1, Sumiyoshi-cho Izumisanoshi, Osaka 598-8540 Japan
IV-1-3	電話番号	+81-724-63-1564
IV-1-4	ファクシミリ番号	+81-724-63-1943
IV-1-5	電子メール	yamato@hkc.fujioil.co.jp

特許協力条約に基づく国際出願願書

PP12451WO

原本（出願用） - 印刷日時 2002年06月18日（18.06.2002）火曜日 13時58分40秒

V	国の指定		
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	EP: AT BE CH&LI CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LU MC NL PT SE TR 及びヨーロッパ特許条約と特許協力条約の締約国で ある他の国	
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	CN JP US	
V-5	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて、 規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。		
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)	
VI-1	先の国内出願に基づく優先権 主張		
VI-1-1	出願日	2001年06月21日 (21.06.2001)	
VI-1-2	出願番号	特願2001-187783	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VII-1	特定された国際調査機関 (ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て (米国 を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性 喪失の例外に関する申立て	-	
IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書 (申立てを含む)	4	-
IX-2	明細書	22	-
IX-3	請求の範囲	1	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	0	-
IX-7	合計	28	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フルキア ディスク
IX-19	要約書とともに提示する図の 番号		
IX-20	国際出願の使用言語名:	日本語	

特許協力条約に基づく国際出願願書

PP12451W0

原本（出願用） - 印刷日時 2002年06月18日（18.06.2002）火曜日 13時58分40秒

X-1	出願人、代理人又は代表者の 記名押印	
X-1-1	名称	不二製油株式会社
X-1-2	署名者の氏名	浅原 和人
X-1-3	権限	代表者
X-2	提出者の記名押印	
X-2-1	氏名(姓名)	津崎 真一
X-3	提出者の記名押印	
X-3-1	氏名(姓名)	荒木 秀雄
X-4	提出者の記名押印	
X-4-1	氏名(姓名)	橋本 征雄

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	21.06.02
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補完する書類又は図面であってその後期間内に提出されたものの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補完の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用写しを送付していない	✓

国際事務局記入欄

II-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

明 細 書

可溶性イソフラボン含有組成物の製造方法

5

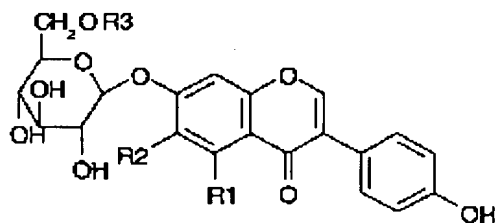
技 術 分 野

本発明は、可溶性イソフラボン含有組成物の製造方法に関するものである。

背 景 技 術

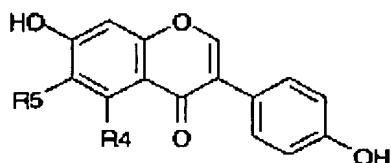
- 10 大豆イソフラボンは、大豆中に存在する 3-フェニルクロモン骨格を有する化合物群であり、具体的には配糖体であるダイジン、ゲニスチン、グリシチン、及びマロニル配糖体である 6''-0-マロニルダイジン、6''-0-マロニルゲニスチン、6''-0-マロニルグリシチン、及びアセチル配糖体である 6''-0-アセチルダイジン、6''-0-アセチルゲニスチン、6''-0-アセチルグリシチン、及びアグリコンであるダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン等が存在する。これらの基本構造及び種類を化 1 ～ 化 2 に示す。

20 (化 1)



化 1 を基本骨格 とする化合物群	R1	R2	R3
ダイジン	H	H	H
ゲニスチン	OH	H	H
グリシチン	H	OCH ₃	H
6''-O-マロニルダイジン	H	H	COCH ₂ COOH
6''-O-マロニルゲニスチン	OH	H	COCH ₂ COOH
6''-O-マロニルグリシチン	H	OCH ₃	COCH ₂ COOH
6''-O-アセチルダイジン	H	H	COCH ₃
6''-O-アセチルゲニスチン	OH	H	COCH ₃
6''-O-アセチルグリシチン	H	OCH ₃	COCH ₃

(化 2)



化 2 を基本骨格 とする化合物群	R4	R5
ダイゼイン	H	H
ゲニステイン	OH	H
グリシテイン	H	OCH ₃

- 5 これらのイソフラボンには、エストロゲン様作用、抗酸化作用などが認められており、癌、骨粗鬆症の予防や更年期障害を緩和させる食品成分として世界的に注目されている。しかしながら、イソフラボンは水に対して難溶性であり、水（25℃）に対する溶解度が 0.002～0.003g
- 10 程度である（文献）がゆえに、食品、特に飲料分野やデザート分野など、製造中や製造後に白濁や沈殿の発生が問題となる分野においては利用が制限され、溶解性の改善が望まれていた。

この課題を改善する方法として、例えば特開平

9-309902 号公報や特開平 10-298175 号公報ではイソフラボン
をサイクロデキストリンで包接することにより水に
対する溶解性を向上させる方法が開示されている。しか
しながら、これらの方法はイソフラボンを予め一定の純
5 度に精製する必要がある、操作が煩雑であること、また
サイクロデキストリンを含有するため、飲料に使用した
場合、フレーバーなどの香気成分をもイソフラボンと一
緒に包接してしまうため香味のバランスが崩れやすく商
品設計がしにくい場合がある。また、サイクロデキスト
10 リン自身の溶解度に左右されるため高濃度には溶解させ
ることができない。一方、特開 2000-325043 号公報では
イソフラボンと無水又は含水プロピレングリコール及び
／又はオクテニルコハク酸澱粉からなる可溶化剤とを水
の存在下で加熱してイソフラボンを溶解させる方法が開
15 示されている。しかしながら、プロピレングリコールや
オクテニルコハク酸澱粉等の食品添加物は、最近は利用
しない方が好まれる傾向にある。さらに、特開
2000-327692 号公報では α -グリコシル糖化合物(デキス
トリン等)の存在化で糖転移酵素を作用させて α -グリ
20 コシルイソフラボン誘導体(ダイジンやゲニスチンにグ
ルコース残基を α -1,4 結合させたもの)にすることによ
り水への溶解性を向上させる方法が開示されている。し
かしながら、本法は等モル以上の α -グリコシル糖化合
物をイソフラボンに結合させなければならないので、工
25 程が煩雑になる上、必然的に固形物当たりのイソフラボ
ン含有量が低下してしまうし、天然に存在するイソフラ

ボンの形態ではない。また、イソフラボン含有組成物を飲料等の液体食品に使用する場合、溶解性および低温での長期安定性が品質上重要であるが、これらに関しては何ら記載されていない。このように以上に挙げた技術は
5 いずれも可溶化剤の添加によるか、イソフラボンを誘導体に化学修飾するかいずれかの方法により、イソフラボンを可溶化するものである。しかし、より簡便な方法で工業的生産に適した方法であって、難溶性のイソフラボンを天然の形で幅広い pH 領域において可溶化する方法に
10 ついては、まだ報告されていない。

本発明の目的は、大豆類を原料として可溶化剤の添加や化学修飾などを施すことなく天然から抽出された状態で幅広い pH 領域において高溶解性であり、かつ冷蔵保存における長期安定性にも優れた可溶性イソフラボン含有
15 組成物の製造方法を提供することにある。

発 明 の 開 示

本発明者らは、上記の課題に対して、研究を進める中で、大豆類中のイソフラボンは溶解度が低いにもかかわらず水で容易に抽出され、そして全く意外にも高濃度状態においても安定に可溶化されていることを発見した。
さらに鋭意研究を重ねた結果、大豆類を抽出した大豆抽出液から pH5.5～7 に調整し、0～17℃に冷却したときに生じる不溶物を除去すると、中性域～微酸性域において
20 溶解性及び冷蔵保存における長期安定性に非常に優れたイソフラボン含有組成物を収率よく得られる知見を得た。

そして、大豆抽出液を pH5.5 未満に調整し、不溶化物を除去すると、同様に酸性域において溶解性に優れたものが得られたが、イソフラボンが蛋白質とともに沈殿してしまう量が多くなり、収率が低下する傾向になるところ、
5 大豆抽出液にプロテアーゼを作用させるとともに酸性低温下で生じる不溶物を除去することにより、イソフラボンの沈殿が防止され、酸性域において溶解性及び冷蔵保存における長期安定性に非常に優れたイソフラボン含有組成物が収率よく得られることを見出し本発明を完成させた。
10

即ち、本発明は、

- (1) pH 2 ～ 7、かつ温度 0 ～ 17℃ に調整された大豆抽出液から、不溶物を除去することを特徴とする可溶性イソフラボン含有組成物の製造方法、
- 15 (2) 大豆抽出液の固形分あたりのイソフラボン含量が 0.2 ～ 20 重量%、粗蛋白質含量が 30 重量% 以下、脂質含量が 4 重量% 以下である上記 (1) に記載の可溶性イソフラボン含有組成物の製造方法、
- (3) 大豆抽出液を調製する工程が、プロテアーゼを作用させずに pH5.5 ～ 7 に調整する工程を含む上記
20 (1) 又は (2) に記載の可溶性イソフラボン含有組成物の製造方法。
- (4) 大豆抽出液を調製する工程が、pH 2 以上 5.5 未満に調整する工程とプロテアーゼを作用させる工程を含む上記 (1) 又は (2) に記載の可溶性イソフラ
25 ボン含有組成物の製造方法。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を具体的に説明する。

本発明の可溶性イソフラボン含有組成物は、大豆抽出液から調製される。大豆抽出液は大豆類から抽出溶媒で抽出されたものをいう。

本発明の原料である大豆類とは、丸大豆、脱皮大豆、脱皮脱胚軸大豆、大豆胚軸、脱脂大豆、脱脂大豆胚軸などであり、特に大豆胚軸はイソフラボンの含量が約1～2重量%と他の大豆類に比べ高く、高濃度のイソフラボン含有組成物を得るには好適な原料である。通常、大豆類は粉碎、圧扁、膨化等の物理的処理、焙煎等の乾熱加熱、蒸煮等の湿熱加熱もしくは乾燥等の加熱処理、または化学的処理等の所望の前処理を施してもよいが、粉碎、圧扁、膨化等の物理的処理は大豆類の細胞を壊さない程度に行うか、あるいは行わない方が好ましい。物理的処理を施した原料を用いて水抽出を行うと、内部に含有している蛋白質や油分などのイソフラボン以外の余分な成分が抽出時に多量に滲出しやすくなり、イソフラボン含有組成物の溶解性や、不溶物を除去する際のイソフラボン収率に支障をきたす場合があるためである。本態様によれば、原料からの蛋白質や脂質の滲出を抑制することが可能である。

また大豆胚軸を原料に用いる場合は、生のままで抽出すると未加熱の大豆胚軸独特の青臭味や収斂味があるため、このような味が少なくなり、かつ焦げすぎによる苦味が生じない範囲において加熱処理をすることが好まし

い。加熱方法としては乾熱加熱、湿熱加熱などが挙げられ、いずれも公知の加熱方法を使用すれば良い。例えば大豆胚軸の乾熱加熱はガスロースター（フジローヤル（株）製等）、電熱ロースター（日本硝子（株）製等）、熱風ロースター（Buhler 社製等）、マイクロ波加熱機（新日本無線（株）製等）、間接加熱式クッカーなどを使用できる。好ましくは 100℃以上の温度で処理するのが良い。加熱度合いは、大豆胚軸の水分含量で規定することができ、1～9.5 重量%、好ましくは 3～9 重量%になるように加熱処理するのが良い。また大豆胚軸の湿熱加熱は、イソフラボンが溶出しない程度に適度な水分の存在下で加熱する方法であればよく、蒸気処理の他、含水処理後加熱する方法なども用いることができる。例えば蒸気処理の場合、オートクレーブ、クッカーやスチームピーラーなどの食品工業において一般的に用いられているスチームング装置を使用できる。

さらに、上記の大豆類からイソフラボンを水抽出する際は、前処理として大豆類を 4～80℃、好ましくは 4～40℃の水又は塩（カルシウム塩、ナトリウム塩、カリウム塩などの）溶液或いは緩衝液（リン酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液などの）等の水性溶媒と接触させて洗浄することにより、イソフラボン以外の可溶性無窒素物、窒素化合物、灰分等の可溶性成分を優先的に除去することが、大豆抽出液中のイソフラボン濃度を高める上で好ましい。この際、4℃未満での洗浄も十分可能であるが、冷却のための費用も増大し実用性が低いため好

ましくない。洗浄時の大豆類と水との重量比は特に制限されないが、通常 1 : 3 ~ 1 : 30、好ましくは 1 : 5 ~ 1 : 15 である。水との接触時間は液部のイソフラボン以外の可溶性成分の抽出量が最大になるよう適宜調節するが、通常約 5 分 ~ 240 分である。水との接触方法は、上記水抽出法と同様、バッチ式、連続式、向流式、多段式など種々の方法で行うことができる。このようにして洗浄を行った後、例えばろ過、遠心分離等の固液分離により液部を除去し、得られた残渣（大豆類）を回収すればよい。

次に、大豆類または上記のごとく前処理された大豆類からイソフラボンを抽出し、大豆抽出液を得る方法を示す。抽出用溶媒としては、水又は含水アルコール等の水性溶媒を使用することができるが、溶媒中のアルコール濃度が高くなるにつれ大豆中の油分やフェノール類などの悪風味成分も同時に抽出される傾向にあるため、可溶性で風味良好な抽出液を得るには水で抽出することがより好ましい。抽出方法は例えば特開 2000-14348 号公報に記載の方法が利用できる。すなわち、抽出温度はイソフラボンが水で通常抽出される温度で行えば良いが、温度が低すぎる場合にはイソフラボンの収率が低下し、製造上非効率であるため、通常 80℃ 以上、好ましくは 80 ~ 150℃、より好ましくは 80 ~ 100℃ が適当である。抽出時の原料と水との重量比は特に制限されないが、通常 1 : 3 ~ 1 : 30、好ましくは 1 : 5 ~ 1 : 15 である。水との接触時間はイソフラボンの抽出量が最大になるよう適宜

調節するが、通常 5 分～60 分程度である。また、必要に応じて水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、重曹、炭酸ナトリウムなどを添加して抽出時の pH を 8 以上のアルカリ性にするによりイソフラボンの抽出効率を向上させることもできるが、蛋白質等の不要な成分も同時に抽出される傾向になるため、pH は 6～8、好ましくは 6.5～7.5 にしておくことが適当である。さらに、グリセリン脂肪酸エステルやソルビタン脂肪酸エステルなどの界面活性剤を水に対し 0.01～1.0w/v% 添加してもよい。抽出方式はバッチ式、連続式、向流式、多段式など種々の方法で行うことができ、効率を上げるために攪拌したり、抽出液を再度新たな大豆類の抽出溶媒として利用することもできる。

このようにして抽出を行った後、例えばろ過、遠心分離などの固液分離を行い、大豆抽出液を得る。また、これらの大豆抽出液以外にも、豆腐や豆乳の製造時に生じる浸漬廃液や煮豆製造時に生じる煮汁廃液なども、もちろん大豆抽出液として利用できる。なお固液分離の際、抽出残渣を圧搾すると、内部に含有している蛋白や油分などが滲出するため好ましくない。

このようにして得られた大豆抽出液は、イソフラボン含量が固形分換算で通常 0.2～20 重量%、粗蛋白質含量が固形分換算で 30 重量%以下、好ましくは 25 重量%以下、脂質含量が固形分換算で 4 重量%以下、好ましくは 2 重量%以下である。例えば通常大豆を磨碎して抽出して得られる豆乳の粗蛋白質含量は固形分換算で 40～55 重

量%、脂質含量は固形分換算で 25～35 重量%であり、本大豆抽出液は抽出の際の粗蛋白質及び脂質の滲出が抑えられている。

- 5 以上のごとくして得られた大豆抽出液を pH 2～7、かつ温度 0～17℃、好ましくは 0～10℃に冷却した後、10分以上、好ましくは 30 分以上当該温度にて保持することにより低温不溶物を形成させる。pH を 2 未満に調整すると、pH が 2 未満であるとイソフラボン自体の分解が懸念される。また pH が 7 を超えると中性～酸性領域での可溶性が得られない。pH を 2～7 の何れに調整するかは、イソフラボン含有組成物を添加する製品の pH 以下にすることを目安とすればよい。冷却温度は 17℃を超えると添加する製品の pH 以下に pH 調整しても沈殿又は白濁を生じてしまう。pH を 2～7 に調整する場合に使用する酸は、
- 10 通常食品に用いられる無機酸、有機酸であればどのようなものでもよく、例えば塩酸、硫酸、リン酸、酢酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸及びアスコルビン酸などが挙げられるが、塩酸が特に好ましい。その後、例えばろ過、遠心分離などにより当該不溶物を除去して可溶性イソフラボン含有組成物を得る。通常、大豆抽出液に含まれるイソフラボンは、冷却によって蛋白質等が不溶化し、沈殿する際にその蛋白質等と共に沈殿（共沈）しやすい。しかしながら、本発明では粉碎などの物理的処理を施さない原料を用いることにより、原料からの蛋白質等の滲出を抑えることができるため、共沈を防止し、イソフラボンの収率の低下を抑制することができる。
- 15 20 25

一方、不溶物除去時の大豆抽出液の pH が 5.5 以上であれば問題ないが、大豆抽出液を pH5.5 未満の酸性域に調整した場合、当該溶液に含まれる蛋白質が等電点沈殿すると同時に、イソフラボンも蛋白質との相互作用により
5 共沈しやすくなり、低温下での共沈と共に相乗的に収率が低下する傾向になる。本発明者らの知見に寄れば、大豆類の抽出液を pH5.5 未満に調整し、生じた不溶物を除去した後の溶液中のイソフラボン量は大豆抽出液の半分程度にまで減少してしまう。

10 このような場合、イソフラボンの共沈を防ぎ、かつ酸性域での溶解性を向上させる方法として、大豆抽出液に、蛋白質分解酵素（プロテアーゼ）を作用させ、蛋白質が低分子化されたものであること、さらにこれを pH 2 以上 5.5 未満、かつ温度 0 ～ 17℃ において不溶物除去されたもの
15 であることが好ましい。

この場合、プロテアーゼの種類及び作用工程については特に制限されず、エンドプロテアーゼ又は／エキソプロテアーゼを使用することができるが、通常、大豆抽出液の pH は 6 ～ 7 であるため、中性プロテアーゼ或いはアルカリ性プロテアーゼを用い、大豆抽出液に作用させる
20 ことが好適である。さらに、プロテアーゼ中に夾雑物として β -グルコシダーゼが存在すると、本過程においてイソフラボン配糖体中のアグリコン部分と糖部分を結合する β -グルコシド結合が切断されて、アグリコン（ダイゼイン、ゲニステイン、グリシテイン）が遊離してしま
25 う。アグリコンは一般的に配糖体よりも溶解度が低い

- ため望ましくない。従って、プロテアーゼの起源については β -グルコシダーゼ活性の低い動植物起源のものが好ましく、微生物起源のものであっても β -グルコシダーゼ活性が低ければ何ら支障はない。またプロテアーゼ
- 5 を作用させる工程は、大豆抽出液の調製後、かつ pH の酸性域への調整前に作用させることが最も好ましい。抽出前に前処理として大豆類を低温の水と接触させる際に本工程を同時に行う方法や、耐熱性のプロテアーゼを用いて抽出段階で本工程を同時に行う方法も可能であるが、
- 10 これらの場合蛋白質が低分化し、多量に抽出される傾向となる。また下記のごとく大豆抽出液を酸性域に調整した後、酸性プロテアーゼを作用させても良いが、この場合蛋白質が等電点沈殿により不溶化しているため、プロテアーゼの作用が極端に低下してしまう傾向にある。
- 15 プロテアーゼの作用条件は、大豆抽出液中の蛋白質を低分子化できる条件であればよく、プロテアーゼの添加量は力価により適宜調節するが、通常大豆抽出液の固形物に対して固形物換算で 0.01~10 重量% 添加すればよい。反応条件は使用するプロテアーゼの至適条件より適宜調
- 20 節するが、通常、作用 pH は中性プロテアーゼの場合 6~8、アルカリ性プロテアーゼの場合は 8~10、作用温度は 40~60℃、作用時間は 0.5~5 時間が好適である。反応停止には、通常 80℃ 以上で加熱処理することにより当該酵素を失活させる。
- 25 このようにして得られた可溶性イソフラボン含有組成物は、適宜濃度を調整してそのまま使用するか、或いは

必要に応じて中和後、濃縮して得られる濃縮エキスやさらに凍結乾燥、噴霧乾燥などにより乾燥物として使用できる。また、必要により例えばポリスチレン系、メタアクリル系、ODS 系などの吸着剤を用いた精製法やブタノールなどの溶媒を用いた分別法により、イソフラボンがより一層高純度された可溶性イソフラボン含有組成物を得ることもできる。

該組成物は、イソフラボン含有量が固形分中 0.2~10 重量%であり、不溶物を除去した際の pH 以上の製品に用いる場合に、10℃以下の冷蔵保存によっても白濁・沈殿が生じることなく安定性が高く、優れた溶解性を示す。イソフラボン純品の水（25℃）に対する溶解度は 0.002~0.003g 程度であるが、本発明により得られる可溶性イソフラボン含有組成物はイソフラボンとして 0.3g 以上（0.3~100g）、すなわち 100 倍以上多く溶解させることが可能である。よって、中性~微酸性のあらゆる食品、例えば茶系飲料等の中性飲料やコーヒー等の微酸性飲料をはじめ冷菓、デザートなどあらゆる食品に、透明性を保持しつつ、かつ高濃度に利用することができる。なお、本発明において溶解度とは、25℃において溶媒 100g に対して溶解する溶質の最大量（g）のことをいう。

本発明により、従来のイソフラボンの溶解性の問題を一掃することができるため、イソフラボンの利用用途が飛躍的に拡大される。

なお、本発明において、イソフラボン量の測定は（財）

日本健康・栄養食品協会の大豆イソフラボン食品規格基準分析法に従い、下記のように行い、12種類のイソフラボン量の総和を算出する。粗蛋白質含量はケルダール法にて、脂質含量はクロロホルムメタノール混液抽出法にて測定するものとする。

＜イソフラボン量の測定方法＞

イソフラボンとして1～10mgに対応する試料を要すれば粉碎した後精密に秤量し、これに70% (v/v) エタノールを25ml加える。30分間室温で攪拌抽出した後、遠心分離して抽出液を得る。残渣は同様の抽出操作を更に2回行う。計3回分の抽出液を70% (v/v) エタノールで100mlに定容して試験溶液とする。調製した試験溶液を0.45 μ mのフィルターで濾過した後に、下記のHPLC条件により分析する。

カラム YMC-Pack ODS-AM303 (4.6×250mm)

移動相 アセトニトリル：水：酢酸

= 15:85:0.1 ~ 35:65:0.1 (v/v/v)

流速 1.0ml/min

20 温度 35℃

検出 UV254nm

注入量 10 μ L

ダイジン標準品を用いて12種類のイソフラボン濃度（ダイジン換算値）を定量し、下記の定量係数を乗じることにより真のイソフラボン濃度を算出する。イソフラボンの定量係数：ダイジン（1.000）、ゲニスチン（0.814）、

グリシチン (1.090) 、マロニルダイジン (1.444) 、マ
ロニルゲニスチン (1.095) 、マロニルグリシチン (1.351) 、
アセチルダイジン (1.094) 、アセチルゲニスチン (1.064) 、
アセチルグリシチン (1.197) 、ダイゼイン (0.583) 、
5 ゲニスチン (0.528) 、グリシチン (0.740) そして
各種イソフラボン濃度の総和からイソフラボン量を求め
る。

(実施例)

10 以下に実施例を記載するが、この発明の技術思想がこ
れらの例示によって限定されるものではない。

実験例 1

米国産丸大豆 100g に水 500ml を加えて、前処理として
20℃で2時間接触させた後、ろ過により液部を除去した。
15 次いで、残渣に水 500ml を加えて 98℃で 20 分間抽出した
後、ろ過により抽出液を得た。さらに、残渣に水 500ml
を加えて再度 98℃で 20 分間抽出した後、同操作により抽
出液を得た。得られた抽出液を混合し、大豆抽出液を得
た。本液の固形物換算でのイソフラボン含量は 1.3 重量%、
20 粗蛋白質含量は 24 重量%、脂質含量は 1.0 重量%であっ
た。次いで、表 1 に示す温度 20～0℃に冷却した後 30
分間放置した。このときの pH は 6.5 であった。その後、
遠心分離により不溶物を除去して凍結乾燥により粉末化
した。得られたイソフラボン含有組成物について水 100g
25 (25℃) に対するイソフラボンの溶解度 (g) を測定した。
さらに安定性試験としてイソフラボン 10mg 相当量の粉末

を 100ml の水に溶かした後、重曹或いはクエン酸で pH 7 ~ 5.5 に調整して 95℃ で 15 分間加熱殺菌後、10℃ で 1 ヶ月保存した。結果を表 1 に示す。

5 (表 1)

分離温度 (℃)	イソフラボン 溶解度(g)	安定性試験		
		pH7	pH6	pH5.5
20	>0.3	×	×	×
15	>0.3	○	○	○
10	>0.3	○	○	○
0	>0.3	○	○	○

安定性試験評価(○:沈殿なし、×沈殿あり)

表 1 より、大豆抽出液から温度 20℃ 未満で不溶物を除去することにより、得られたイソフラボン含有組成物の水
 10 に対する溶解性が飛躍的に向上し、さらに安定性試験では、pH 7 の中性域から pH5.5 の微酸性域での安定性が非常に良好なものが得られた。

実験例 2

15 米国産丸大豆 100g に水 500ml を加えて、前処理として 20℃ で 2 時間接触させた後、ろ過により液部を除去した。次いで、残渣に水 500ml を加えて 98℃ で 20 分間抽出した後、ろ過により抽出液を得た。さらに、残渣に水 500ml を加えて再度 98℃ で 20 分間抽出した後、同操作により抽出液を得た。
 20 得られた抽出液を混合し、大豆抽出液を得た。このときの pH は 6.5 であった。本液の固形物換算でのイソフラボン含量は 1.3 重量%、粗蛋白質含量は 24 重

量%、脂質含量は 1.0 重量%であった。次に、この液に *Bacillus subtilis* 由来の中性プロテアーゼ（「オリエンターゼ 90N」、阪急共栄物産(株)製）を固形物に対して 0.9 重量%添加し、50℃で 1 時間反応させた。次いで、80℃
 5 で 30 分間加熱して当該酵素を失活させた後、HCl を加えて表 2 に示す pH 及び温度に調整し 30 分間放置し、酸沈殿させた。その後、遠心分離により不溶物を除去し、NaOH を加えて pH6.5 に中和し凍結乾燥により粉末化した。得られたイソフラボン含有組成物について水 100g（25℃）
 10 に対するイソフラボンの溶解度（g）を測定した。さらに安定性試験として得られたイソフラボン含有組成物のイソフラボン 10mg 相当量を 100ml の水に溶かした後、重曹或いはクエン酸で pH 7～3 に調整して 95℃で 15 分間加熱殺菌後、10℃で 1 ヶ月保存した。結果を表 2 に示す。

15

(表 2)

分離 pH	冷却温度 (℃)	イソフラボン 溶解度(g)	安定性試験 pH				
			7	6	5.5	4.5	3.5
5.5	20	>0.3	×	×	×	×	×
5.5	15	>0.3	○	○	○	×	×
4.5	20	>0.3	○	○	○	×	×
4.5	15	>0.3	○	○	○	○	×
3.5	20	>0.3	○	○	○	×	×
3.5	15	>0.3	○	○	○	○	○
2.0	15	>0.3	○	○	○	○	○

安定性試験評価(○:沈殿なし、×沈殿あり)

総合評価(○良好、△可、×不可)

20 表 2 より、大豆抽出液から pH5.5 未満、かつ温度 20℃ 未満で不溶物を除去することにより、得られたイソフラ

ボン含有組成物は純品のイソフラボンよりも水に対する溶解性が飛躍的に向上し、さらに安定性試験において pH 7 の中性域から pH3.5 の酸性域での安定性が良好なものが得られた。

5

実施例 1

米国产丸大豆（イソフラボン含量 0.2 重量%）100g に水 500ml を加えて、前処理として 20℃で 2 時間接触させた後、ろ過により液部を除去した。次いで、残渣に水 500ml
10 を加えて 98℃で 20 分間抽出した後、ろ過により抽出液を得た。さらに、残渣に水 500ml を加えて再度 98℃で 20 分間抽出した後、同操作により抽出液を得た。得られた抽出液を混合し、大豆抽出液を得た。本液の固形物換算でのイソフラボン含量は 1.3 重量%、粗蛋白質含量は 24
15 重量%、脂質含量は 1.0 重量%であった。これを 10℃に冷却した後、当該温度にて 30 分間保持した。このときの pH は 6.5 であった。次いで、遠心分離により不溶物を除去した後、凍結乾燥により粉末化し、可溶性イソフラボン含有組成物 9.4g（イソフラボン含量 1.34 重量%）を得
20 た。このときの丸大豆からのイソフラボンの収率は 63.0%であった。

実施例 2

米国产大豆胚軸（イソフラボン含量 1.6 重量%）100g を
25 ガスロースターを用いて 140℃の熱風で 20 分間乾熱加熱処理した。得られた大豆胚軸 100g に水 500ml を加えて、

前処理として 20℃で 2 時間接触させた後、ろ過により液部を除去した。次いで、残渣に水 500ml を加えて 98℃で 20 分間抽出した後、ろ過により抽出液を得た。さらに、残渣に水 500ml を加えて再度 98℃で 20 分間抽出した後、同操作により抽出液を得た。得られた抽出液を混合し、大豆抽出液を得た。本液の固形物換算でのイソフラボン含量は 6.0 重量%、粗蛋白質含量は 22 重量%、脂質含量は 0.5 重量%であった。これを 10℃に冷却した後、当該温度にて 30 分間保持した。このときの pH は 6.5 であった。次いで、遠心分離により不溶物を除去した後、凍結乾燥により粉末化し、可溶性イソフラボン含有組成物 18.7g (イソフラボン含量 6.06 重量%) を得た。このときの大豆胚軸からのイソフラボン収率は 70.8%であった。

15 実施例 3

米国産丸大豆 (イソフラボン含量 0.2 重量%) 100g に水 500ml を加えて、前処理として 20℃で 2 時間接触させた後、ろ過により液部を除去した。次いで、残渣に水 500ml を加えて 98℃で 20 分間抽出した後、ろ過により抽出液を得た。さらに、残渣に水 500ml を加えて再度 98℃で 20 分間抽出した後、同操作により抽出液を得た。得られた抽出液を混合し、大豆抽出液を得た。本液の固形物換算でのイソフラボン含量は 1.3 重量%、粗蛋白質含量は 24 重量%、脂質含量は 1.0 重量%であった。このときの pH は 6.5 であった。この液に *Bacillus subtilis* 由来の中性プロテアーゼ (「オリエンターゼ 90N」、阪急共栄物産

(株)製) を固形物に対して 0.9 重量%添加し、50℃で 1 時間反応させた。次いで、80℃で 30 分間加熱して当該酵素を失活させた後、HCl を加えて pH3.5 に調整し、さらに 10℃に冷却して 30 分間放置した。その後、遠心分離により不溶物を除去し、NaOH を加えて pH6.5 に中和し凍結乾燥により粉末化し、可溶性イソフラボン含有組成物 8.8g (イソフラボン含量 1.40 重量%) を得た。このときの丸大豆からのイソフラボンの収率は 61.6%であった。

10 実施例 4

実施例 2 と同様にして得た大豆胚軸 (イソフラボン含量 1.6 重量%) 100g に水 500ml を加えて、前処理として 20℃で 2 時間接触させた後、ろ過により液部を除去した。次いで、残渣に水 500ml を加えて 98℃で 20 分間抽出した後、ろ過により抽出液を得た。さらに、残渣に水 500ml を加えて再度 98℃で 20 分間抽出した後、同操作により抽出液を得た。得られた抽出液を混合し、大豆抽出液を得た。本液の固形物換算でのイソフラボン含量は 6.0 重量%、粗蛋白質含量は 22 重量%、脂質含量は 0.5 重量%であった。このときの pH は 6.5 であった。Bacillus subtilis 由来の中性プロテアーゼ (「オリエンターゼ 90N」、阪急共栄物産(株)製) を固形物に対して 0.9 重量%添加し、50℃で 1 時間反応させた。次いで、80℃で 30 分間加熱して当該酵素を失活させた後、HCl を加えて pH3.5 に調整し、さらに 10℃に冷却して 30 分間放置した。その後、遠心分離により不溶物を除去し、NaOH を加えて pH6.5 に中和し

凍結乾燥により粉末化し、可溶性イソフラボン含有組成物 15.5g (イソフラボン含量 6.32 重量%) を得た。このときの大豆胚軸からのイソフラボンの収率は 61.2% であった。

5

実施例 5

実施例 4 と同じ方法で得られた大豆抽出液を、プロテアーゼを作用させずに HCl を加えて pH3.5 に調整し、さらに 10℃ に冷却して 30 分間放置した。その後、遠心分離により不溶物を除去し、NaOH を加えて pH6.5 に中和し凍結乾燥により粉末化し、可溶性イソフラボン含有組成物 10.3g (イソフラボン含量 4.72 重量%) を得た。このときの大豆胚軸からのイソフラボンの収率は 30.4% であった。得られた該組成物は水への溶解性は非常に良好であったが、イソフラボン収率が低くなった。これは酸性下で不溶物を除去した際に、イソフラボンが不溶物とともに除去されたためと考えられる。

10

15

実施例 6

実施例 4 で得た可溶性イソフラボン含有組成物 10g を 100ml の水に溶解し、活性化させたスチレンジビニルベンゼン系合成吸着剤(「ダイヤイオン HP-20」、三菱化成(株)製) 100ml を充填したカラム(φ2.5cm×20cm)に 100ml/hr の流速で通液した。次いで水 200ml、20% エタノール 200ml で順次洗浄して夾雑物を除去した後、70% エタノール 300ml で目的物を溶出した。この溶液を減圧濃縮によりエ

20

25

タノールを除去した後、凍結乾燥して可溶性イソフラボン含有組成物 1.5g (イソフラボン含量 26.2 重量%) を得た。

5

産業上の利用可能性

本発明により、純品のイソフラボンの約 100 倍以上もの高溶解性を有し、かつ冷蔵で長期に保存しても沈殿や白濁等の生じない、安定性に優れたイソフラボン含有組成物であって、しかも大豆類を原料として可溶化剤の添加
10 や化学修飾などを施すことなく天然の状態で簡便かつ収率よく得ることができるようになった。これにより、食品分野での使用用途が飛躍的に拡大され、産業上極めて有意義である。

15

請 求 の 範 囲

1. pH 2 ～ 7、かつ温度 0 ～ 17℃ に調整された大豆抽出液から、不溶物を除去することを特徴とする可溶性
5 イソフラボン含有組成物の製造方法。
2. 大豆抽出液の固形分あたりのイソフラボン含量が 0.2
 ～ 20 重量%、粗蛋白質含量が 30 重量% 以下、脂質含
 量が 4 重量% 以下である請求の範囲 1 に記載の可溶
 性イソフラボン含有組成物の製造方法。
- 10 3. 大豆抽出液を調製する工程が、プロテアーゼを作用
 させずに pH5.5 ～ 7 に調整する工程を含む請求の範
 囲 1 又は 2 に記載の可溶性イソフラボン含有組成物
 の製造方法。
- 15 4. 大豆抽出液を調製する工程が、pH 2 以上 5.5 未満に
 調整する工程とプロテアーゼを作用させる工程を含
 む請求の範囲 1 又は 2 に記載の可溶性イソフラボン
 含有組成物の製造方法。

要 約 書

大豆類を原料として可溶化剤の添加や化学修飾などを施すことなく天然の状態で、中性～酸性下において高溶解性であり、かつ冷蔵での長期安定性に優れた可溶性イソフラボン含有組成物の製造方法を提供する。

大豆類の水抽出液から pH 2 ～ 7、かつ温度 0 ～ 17℃ において不溶物を除去することにより、中性域から酸性域での溶解性および冷蔵安定性に非常に優れたイソフラボン含有組成物が効率よく得られる。